

БАВОЛ А.В.¹✉, ВЕЛИКОЖОН Л.С.¹, ПИКАЛО С.М.², ДУБРОВНА О.В.¹

¹ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

² Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН України,
Україна, 08853, Київська обл., Миронівський р-н, с. Центральне, вул. Центральна, 68

✉ bavoll@rambler.ru, (050) 817-75-13

IRAP-АНАЛІЗ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ ТРИТИКАЛЕ, СТІЙКИХ ДО ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ

Одним із найважливіших напрямів сучасної біотехнології, який вже отримав широке практичне застосування, є клітинна селекція як метод створення нових форм рослин шляхом виділення мутантних клітин і соматональних варіацій у селективних умовах. Для підвищення ефективності селекції *in vitro* та вирішення проблеми керування соматональною варіабельністю важливо зрозуміти причини її виникнення і розмах. Для цього все ширше використовують молекулярні маркери, що дозволяють виявити генетичні зміни у клітинних форм та індукованих із них рослин.

Оскільки мобільні генетичні елементи дуже широко представлені в геномах рослин, вони представляють значний інтерес для молекулярно-генетичних досліджень. Так, у кукурудзи 49–78 % геному складається з ретротранспозонів [1], а у пшениці близько 90 % ДНК представлено повторюваними послідовностями, з них 68 % – мобільними генетичними елементами [2]. Численними дослідженнями доведено, що культивування *in vitro* може бути потужним стресовим чинником [3, 4] та здатне викликати активацію мобільних генетичних елементів [5, 6], що може призводити до виникнення мутацій або зміни рівня експресії генів [7]. Доведено підвищення активності ретротранспозонів за умов біотичного/абіотичного стресу (поранення, дія патогенів, присутність різних речовин) [5, 8, 9] та виявлено їх транскрипційну активність [10]. Підвищення активності ретротранспозонів за дії стресів свідчить про значну роль цих елементів у формуванні відповіді на дію стресових чинників.

Накопичені на сьогоднішній день дані про мобільні генетичні елементи дозволили розробити способи оцінки поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими повторами, зокрема довгих термінальних ділянок (LTR) ретротранспозонів [11, 12]. У науковій літературі описана можливість використання праймерів, специфічних до LTR послідовностей ретротранспозонів,

для виявлення поліморфізму між досліджуваними формами за допомогою ПЛР-фінгерпринту на основі IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)-аналізу [11–15]. Перевагою такого підходу є можливість одночасного аналізу багатьох анонімних локусів у різних ділянках геному. Численні джерела з окресленої проблематики свідчать про ефективність використання цього методу для дослідження генетичних зв'язків між популяціями та видами [16], генетичного картування та аналізу соматональних варіацій у злакових культур [6]. Однак на сьогодні все ще обмаль даних про мінливість рослин-регенерантів, отриманих із калюсних культур за дії сублетальних стресових чинників, особливо у такого молодого амфідиплоїдного виду, як тритикале, субгеноми якого не пройшли еволюційного шляху коадаптації. У зв'язку з цим метою нашої роботи було проаналізувати рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими повторами LTR ретротранспозонів у рослин-регенерантів тритикале, отриманих за клітинної селекції на стійкість до водного дефіциту.

Матеріали і методи

У цій роботі вивчали: 1) вихідний матеріал – рослини тритикале лінії 38/1276 (10 рослин); 2) стійкі до водного дефіциту рослини-регенеранти, отримані шляхом клітинної селекції (14 рослин); 3) контрольні рослини-регенеранти, отримані з калюсів, без проведення клітинної селекції (14 рослин).

Умови проведення клітинної селекції наведено у роботі [17]. Для моделювання водного дефіциту як селективний агент застосовували низькомолекулярний маніт, який додавали до модифікованого середовища МС. Досліджували рослини-регенеранти R0, отримані з калюсних культур, на селективному середовищі з сублетальною концентрацією маніту 0,6 М, які були проаналізовані на стійкість до водного дефіциту

як в умовах *in vitro*, так і в умовах вегетаційного досліджу.

Екстракцію ДНК з листків проводили з використанням комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ Росспоживнагляду, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі. ПЛР проводилася на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Кінцевий об'єм реакційної суміші складав 20 мкл: 10 ммоль TRIS-HCl, 50 ммоль KCl, 2,0 ммоль хлориду магнію, 2 ммоль кожного дезоксинуклеотидтрифосфату (dNTP), 0,2 мкл праймера, 1 од. акт. Taq ДНК-полімерази та 100–130 нг досліджуваної ДНК.

Ампліфікація проводилася за такою програмою: початкова денатурація при 94°C 4 хв; 34 цикли (денатурація 94°C – 30 с, відпал 55°C – 1 хв, елонгація 72°C – 3 хв) та фінальна елонгація 72°C – 5 хв. У дослідженнях були використані IRAP-праймери до LTR ділянок різних ретротранспозонів (табл. 1), що показали свою ефективність під час аналізу злакових культур, зокрема тритикале [18, 19].

До реакційної суміші праймери додавали окремо або в комбінації (два праймери одночасно). Продукти ампліфікації розділяли в 1,5 % агарозному гелі, забарвлювали розчином бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі і фотографували. Для оцінки розмірів продуктів ампліфікації використовували маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Розмір продуктів ПЛР визначали за допомогою пакета прикладних програм TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics). Перевірку стабільності синтезу ампліконів здійснювали шляхом трикратного повторення ампліфікації на тому ж рослинному матеріалі.

Результати та обговорення

На першому етапі дослідження важливо було переконатися в ефективності досліджуваних праймерів та можливості їхнього застосування для аналізу геному тритикале. Для цього згідно з описаними методиками проводили ПЛР з кожним індивідуальним праймером на зразках 10 довільних рослин вихідного сорту. За характером отриманих спектрів продуктів ампліфікації ДНК було виділено три групи праймерів: 1) високоефективні (Su, Wh, Ni, Wi1, Wi2) – праймери, за використання яких у спектрах продуктів ПЛР можна чітко ідентифікувати визначену кількість ампліконів; 2) неефективні (Wis) – праймери, за використання яких формувався суцільний шлейф із продуктів ПЛР, що не давало можливості відрізнити окремі амплікони; 3) неробочі (Da, Sa, St) – праймери, за використання яких ПЛР не відбувалася.

У ході роботи нами проводилося визначення генетичної гомогенності контрольних рослин за досліджуваними локусами. Всі високоефективні праймери (Su, Wh, Ni, Wi1, Wi2) демонстрували ідентичні спектри продуктів ампліфікації у різних зразків. Отримані дані свідчать, що у вихідному матеріалі (рослинах) за досліджуваними локусами відсутній природний та/або спонтанний поліморфізм. Загалом у вихідних рослин спектр продуктів ампліфікації ДНК, залежно від використаного праймера, складався з 8–17 фрагментів розміром від 305 до 3300 п.н.

Наступним етапом роботи було виявлення поліморфізму ДНК в геномі рослин-регенерантів тритикале, отриманих шляхом клітинної селекції. Для цього застосовували праймери, що показали свою ефективність на контрольних рослинах. Серед 62 проаналізованих IRAP-локусів виявлено 12 поліморфних (табл. 2): 4 за викори-

Таблиця 1

IRAP-праймери, що були використані в дослідженні

Праймер	Ретротранспозон	Нуклеотидна послідовність
Wis	Wis2	5'-TAATTTCTGCAACGTTCCCCAACA-3'
Wi1	Wilma	5'-AGCATGATGCAAAATGGACGTATCA-3'
Wi2	Wilma	5'-AGAGCCTTCTGCTCCTCGTTGGGT-3'
Da	Daniela	5'-TACCCCTACTTTAGTACACCGACA-3'
Wh	Wham	5'-GGAAAAGTAGATACGACGGAGACGT-3'
Ni	Nikita	5'-CGCTCCAGCGGTAAGTCCG-3'
Sa	Sabrina	5'-GCAAGCTTCCGTTTCCGC-3'
Su	Sukkula	5'-GATAGGGTTCGCATCTTGGGCGTGAC-3'
St	Stowaway	5'-CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT-3'

Розмір ампліконів у спектрах продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків тритикале за використання різних праймерів

Праймер	Ретротранспозон	Кількість ампліконів, шт	Розмір ампліконів, п.н.
Su	Sukkula	12	305, 338, 415, 458, 623, 667, 775 , 1050, 1137 , 1217, 1479 , 1595
Wh	Wham	17	1023, 1090, 1123, 1194, 1268, 1324, 1409, 1482, 1547, 1677, 1710, 1920, 2117, 2234, 2429, 2500 , 2955
Ni	Nikita	8	1040, 1067, 1179, 1186, 1314, 1436, 3020, 3300
Wi1	Wilma	15	654 , 789 , 893, 927 , 992, 1019, 1214, 1274, 1340, 1476 , 1500 , 1516, 1708, 1753 , 1941
Wi2	Wilma	10	1116, 1184, 1307, 1348, 1591, 1736, 1792, 2003, 2197, 2365

Примітка: * – жирним шрифтом виділено поліморфні амплікони.

стання праймера Su, 2 за використання праймера Wh та 6 за використання праймера Wi1.

Таким чином, найбільш інформативними праймерами виявилися Wi1 та Su. Загалом із 14 досліджуваних рослин-регенерантів, отриманих шляхом клітинної селекції, було виявлено 4, в спектрах продуктів ампліфікації ДНК яких спостерігається втрата окремих ампліконів. Причиною виявленого поліморфізму є точкові мутації в LTR ділянках (сайтах зв'язування праймера) та/або делеції. В той же час серед такої ж кількості проаналізованих контрольних рослин-регенерантів, отриманих із калюсів, без проведення клітинної селекції не було виявлено жодних відмінностей порівняно з вихідними рослинами.

Згідно з даними наукових досліджень, клітини, в яких присутні активні мобільні елементи, генетично більш нестабільні ніж ті, в яких ці ділянки генома не активні [20]. Тому ми припускаємо, що одним із механізмів адаптації до стресових умов є збільшення геномної нестабільності та відповідно розширення генетичної різноманітності, що в цих умовах проявляється на рівні популяцій клітин. Таким чином, за використання праймерів Su, Wh та Wi1 геномів рослин-регенерантів тритикале, отриманих шляхом клітинної селекції на стійкість до водного дефіциту, можна ідентифікувати делеції ДНК та точкові мутації в LTR ділянках.

Комбінування різних IRAP-праймерів дозволяє збільшити число досліджуваних локусів. Зі схемою IRAP-аналізу, запропонованою Календарем, Шультманом [12], синтез ампліконів відбувається в локусах, розташованих між інвертованими ретротранспозонами та в локусах між одиночним LTR ("solo-LTR") і ретротранспозоном (рис. 1 а).

Тому для розширення спектра ампліконів у продуктах ПЛР досліджуваних зразків (рис. 1 б) нами було випробувано методику поєднання IRAP-праймерів до різних ретротранспозонів в одній реакції.

У ході дослідження нами експериментальним шляхом були підібрані пари IRAP-праймерів, за використання яких у спектрах продуктів ПЛР виявлялися поліморфні амплікони. Найбільш інформативними були такі комбінації: Su/Ni, Wh/Sa та Su/Sa. За такого підходу із 28 проаналізованих IRAP-локусів виявлено 9 поліморфних (що складає понад 32 %). Показано, що за використання пари праймерів Su/Ni у трьох рослинах-регенерантах (рис. 2) у спектрах продуктів ПЛР спостерігається поява нових фрагментів.

На думку Байрама та співавторів [6], причиною явищ такого роду є транспозиція ретротранспозонів. Відповідно виявлені нами амплікони розміром 320 п.н. у регенеранта № 2, 990 п.н. у регенеранта № 3 та 534 п.н. у регенеранта № 9 свідчать про активацію та транспозицію Sukkula/Nikita в геномі рослин-регенерантів тритикале, отриманих шляхом клітинної селекції.

Оскільки в ході дослідження нами встановлено, що поліморфні амплікони найчастіше мали розмір менший 1000 п.н, однією з переваг застосування комбінації праймерів є те, що в спектрах продуктів ПЛР більшість отриманих фрагментів були відносно низькомолекулярними. А за використання окремих праймерів синтезувалися відносно високомолекулярні (розміром більше 1000 п.н.) амплікони.

Раніше нами вже повідомлялося про активацію ретротранспозону Cassandra у м'якої пшениці в процесі добору на стійкість до водного дефіциту [21] та показано специфічність змін у

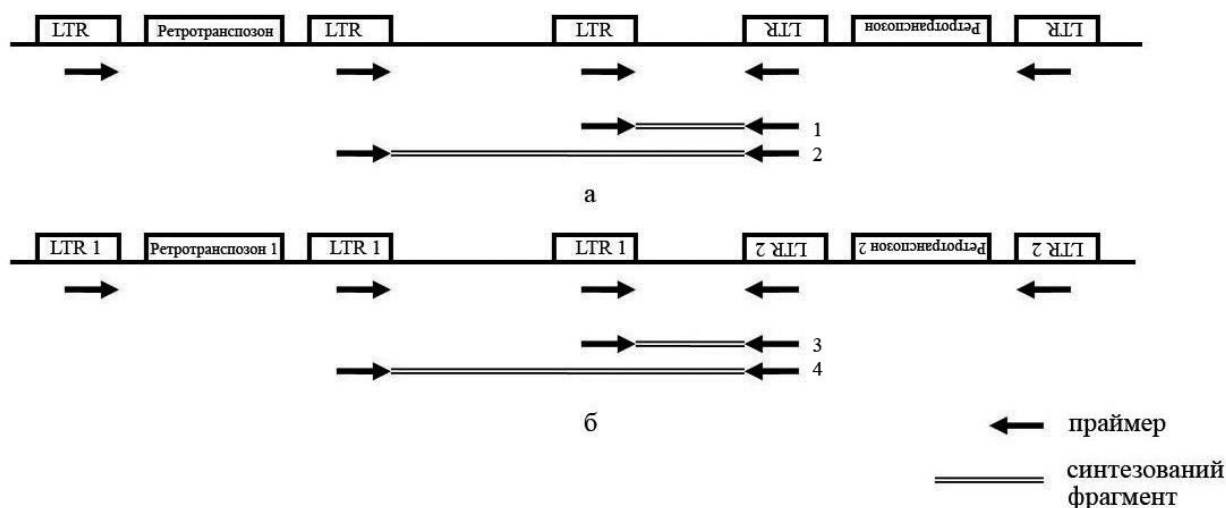


Рис. 1. Схема синтезу фрагментів ДНК (ампліконів), запропонована Календарем, Шульманом [12] за використання одного (а) та комбінації двох (б) IRAP-праймерів (власна розробка)

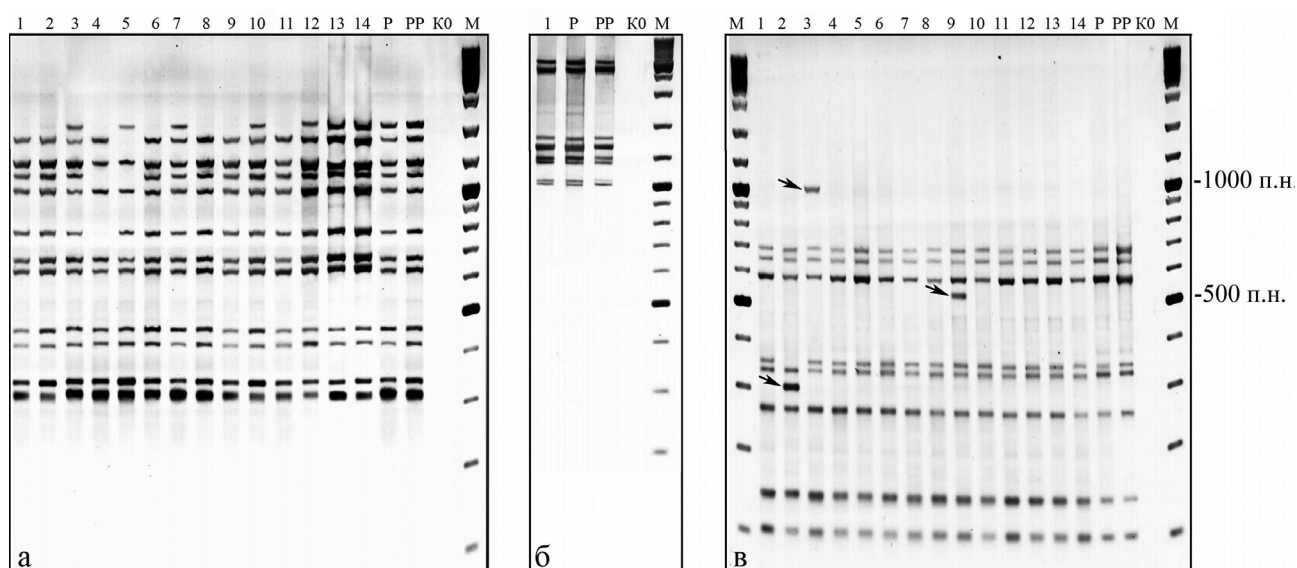


Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за використання праймерів Su (а), Ni (б) та їх комбінації Su/Ni (в): М – маркер молекулярних мас (GeneRuler DNA Ladder Mix); 1–14 рослини-регенеранти, отримані шляхом клітинної селекції; Р – рослини вихідного сорту; РР – рослини-регенеранти, отримані без проведення клітинної селекції; КО – негативний контроль (ТЕ-буфер). Стрілками вказано нові фрагменти

спектрах продуктів ампліфікації ДНК, які відбуваються за прямої та ступінчастої клітинної селекції. Експериментальні дані, одержані на тритикале, свідчать, що саме стресовий чинник (сублетальна концентрація маніту) здатний індукувати транспозицію ретротранспозонів Sukkula/Nikita, оскільки у контрольних рослин-регенерантів, отриманих без впливу стресора, їх активність не виявлена. Водночас транспозиція МГЕ та значна кількість виявлених делецій (точко-

вих мутацій) в LTR ділянках ретротранспозонів може свідчити про загальну нестабільність геному тритикале, що є штучним амфідиплоїдом, а також вказувати на проходження процесу коадаптації пшеничного та житнього субгеномів.

Висновки

У ході дослідження нами доведено, що за використання праймерів Su, Wh та Wil1 геномів рослин-регенерантів тритикале, отриманих шля-

хом клітинної селекції на стійкість до водного дефіциту, можна ідентифікувати делеції ДНК та точкові мутації в LTR ділянках, а за використання пари IRAP-праймерів Su/Ni виявлено транспозицію МГЕ. Одержані дані свідчать, що саме за дії сублетальної концентрації маніту відбувається транспозиція ретротранспозонів Sukkula/Nikita, оскільки у контрольних рослин-регенерантів, отриманих без впливу стресора їхня активність не встановлена. Виявлений генетичний поліморфізм може свідчити про загальну нестабільність генома тритикале, що є штучним амфідиплоїдом, а також вказувати на проходження процесу коадаптації пшеничного та житнього субгеномів.

рантів, отриманих без впливу стресора їхня активність не встановлена. Виявлений генетичний поліморфізм може свідчити про загальну нестабільність генома тритикале, що є штучним амфідиплоїдом, а також вказувати на проходження процесу коадаптації пшеничного та житнього субгеномів.

ЛІТЕРАТУРА

- SanMiguel P., Bennetzen J.L. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons // *Annals of Botany*. – 1998. – 82. – P. 37–44.
- Li W., Zhang P., Fellers J.P., Friebe B., Gill B.S. Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome // *Plant J.* – 2004. – 40, № 4. – P. 500–511.
- Cassells A.C., Curry R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2001. – 64. – P. 145–157.
- Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J., Dommes J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures // *Plant Growth Regul.* – 2002. – 37. – P. 263–285.
- Grandbastien M.-A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions // *Trends Plant Sci.* – 1998. – 3. – P. 181–187.
- Bayram E., Yilmaz S., Hamat-Mecbur H. *Nikita* retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant OMICS: Journal of Plant Molecular Biology & Omics*. – 2012. – 5, № 3. – P. 211–217.
- Todorovska E. Retrotransposons and their role in plant – genome evolution // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2007. – 21. – P. 294–305.
- Wessler S.R. Plant retrotransposons: turned on by stress // *Curr. Biol.* – 1996. – 6. – P. 959–961.
- Ikeda K., Nakayashiki H., Takagi M., Tosa Y., Mayama S. Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* // *Mol Genet Genomics*. – 2001. – 266. – P. 318–325.
- Bonchev G., Georgiev S., Pearce S. Retrotransposons and ethyl methanesulfonate-induced diversity in hexaploid wheat and *Triticale* // *Cent Eur J Biol.* – 2010. – 5, № 6. – P. 765–776
- Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – 98. – P. 704–711.
- Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // *Nature Protocols*. – 2006. – 1, № 5. – P. 2478–2484.
- Leigh F., Kalendar R., Lea V., Donini P., Schulman A.H. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques // *Mol. Gen. Genomics*. – 2003. – 269. – P. 464–474.
- Боронникова С.В., Календарь Р.Н. Использование IRAP-метода для анализа генетической изменчивости популяций ресурсных и редких видов растений // *Генетика*. – 2010. – 46, № 1. – С. 44–50.
- Цветков И.А., Иванов А.Н., Глазко В.И. Генетическая дифференциация соргов риса по IRAP-маркерам // *Изв. ТСХА*. – 2006. – 4. – С. 155–159.
- Pasquali M., Dematheis F., Gullino M.L., Garibaldi A. Identification of Race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on Lettuce by Inter-Retrotransposon Sequence-Characterized Amplified Region Technique // *Phytopathology*. – 2007. – 97, № 8. – P. 987–996.
- Пикало С.В., Зінченко М.О., Волощук С.І., Дубровна О.В. Селекція *in vitro* тритикале озимого на стійкість до водного дефіциту // *Biotechnologia Acta*. – 2015. – 8, № 2. – С. 69–77.
- Trebichalsky A., Kalendar R., Schulman A., Stratula O., Gálová Z., Balážová Ž., Chňápek M. Detection of genetic relationships among spring and winter triticale (\times *Triticosecale* Witt.) and rye cultivars (*Secale cereale* L.) by using retrotransposon-based markers // *Czech J. Genet. Plant Breed.* – 2013. – 49. – P. 171–174.
- Bento M., Pereira H.S., Rocheta M., Gustafson P., Viegas W., Silva M. Polyploidization as a Retraction Force in Plant Genome Evolution: Sequence Rearrangements in Triticale // *PLoS ONE*. – 2008. – 3, № 1. – e1402.
- Evrensel C., Yılmaz S., Temel A., Gozukirmizi N. Variations in BARE-1 insertion patterns in barley callus cultures // *Genet. Mol. Res.* – 2011. – 10, № 2. – P. 980–987.
- Bavol A.V., Zinchenko M.O., Dubrovna O.V. Molecular polymorphism of cellular lines of wheat, with resistant to metabolites of *G. graminis* var. *Triticis*, under osmotic stress // *Tsitol Genet.* – 2014. – 48, № 1. – P. 60–66.

BAVOL A.V.¹, VELIKODZON L.S.¹, PYKALO S.V.², DUBROVNA O.V.¹

¹ *Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: bavol1@rambler.ru*

² *V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Ukraine, 08853, Kyiv region, Tsentralne v., Tsentralna str., 68*

IRAP-ANALYSIS OF TRITICALE PLANTS-REGENERANTS, RESISTANT TO WATER DEFICITE

Aim. The analysis of DNA polymorphism in loci, flanked by inverted repeats of LTR retrotransposons in plants-regenerants of triticale, obtained by *in vitro* selection for resistance to water deficite. **Methods.** IRAP-PCR of triticale genome DNA for identification of polymorphism. **Results.** We have identified DNA deletions and/or point mutations in the LTR loci at the using of primers *Su*, *Wh* and *Wil* in regenerants of triticale, obtained by *in vitro* selection for resistance to water deficite. We experimentally selected the pair of IRAP-primers in order to detect polymorphic amplicons. The emergence of new amplicons in spectra of PCR products in plants-regenerants at the using a pair of primers Su/Ni was shown. **Conclusions.** The observed genetic polymorphisms may be indicative of the overall instability of the triticale genome, which a synthetic amphidiploider and indicate the passing of co-adaptation process wheat and rye subgenomics.

Keywords: Triticale, IRAP-analysis, *in vitro* selection.